

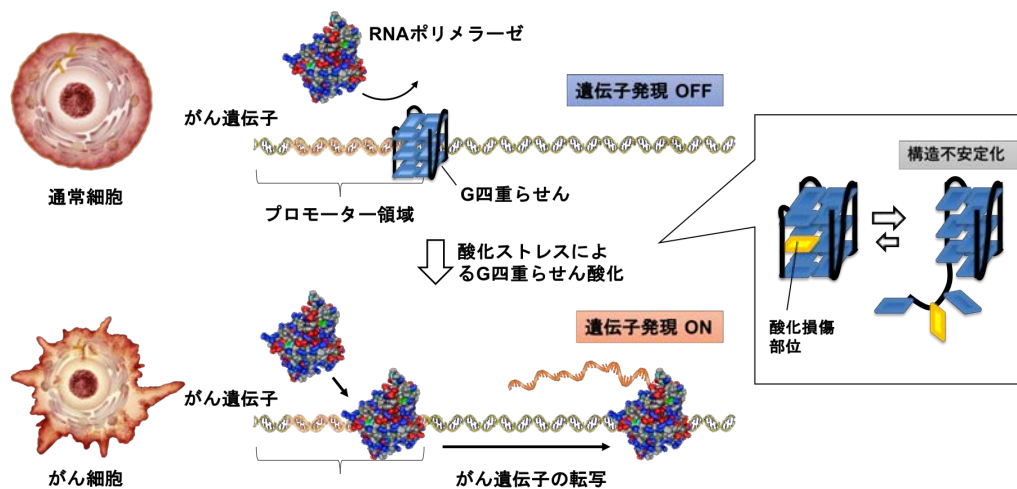
酸化ストレスで損傷したがん遺伝子の DNA 構造を回復し、 がんの予防・治療を行う新規核酸医薬品を開発

甲南大学先端生命工学研究所の杉本直己所長と高橋俊太郎講師は、酸化ストレスにより損傷したがん遺伝子の DNA 四重らせん構造を回復させる核酸分子の開発に成功しました。今回開発された分子は、がんの予防や治療を行う新規核酸医薬品としての活用が期待できます。この研究成果は、米国化学会誌「Journal of the American Chemical Society 誌」誌のオンライン版に掲載され、掲載号の表紙 (Supplementary Journal Cover) としても採択されました。なお、本研究は、韓国ポハン工科大学校とスロベニア国立 NMR センターとの国際共同研究で行われました。

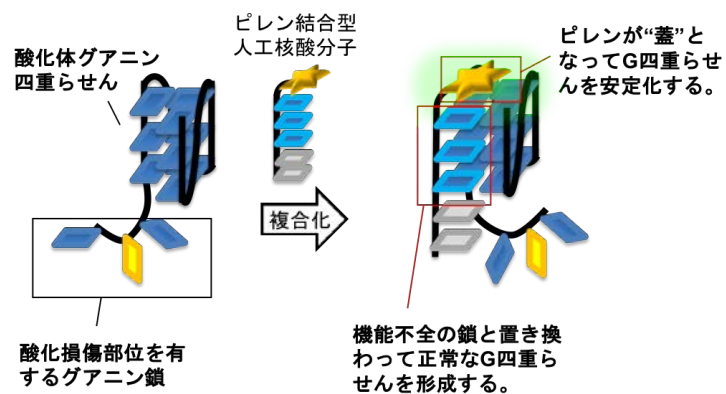
【研究概要】

生体内での DNA (デオキシリボ核酸) の標準構造は二重らせん構造ですが、がん遺伝子にはグアニン四重らせん (G 四重らせん) を形成する配列が多く含まれ、その形成によってがん遺伝子の発現がコントロールされています。細胞内の分子環境のうち酸化的環境のレベルが向上すると、G 四重らせんのグアニン塩基が酸化されることが知られています。がん細胞は健康細胞よりも酸化的レベルが高いことから、がん遺伝子上の G 四重らせんの酸化が細胞のがん化の原因の一つと考えられてきました (※1)。しかしこのような酸化損傷を受けた G 四重らせんをターゲットとし、がんの予防や治療を行うことのできる医薬品の開発はこれまでありませんでした。

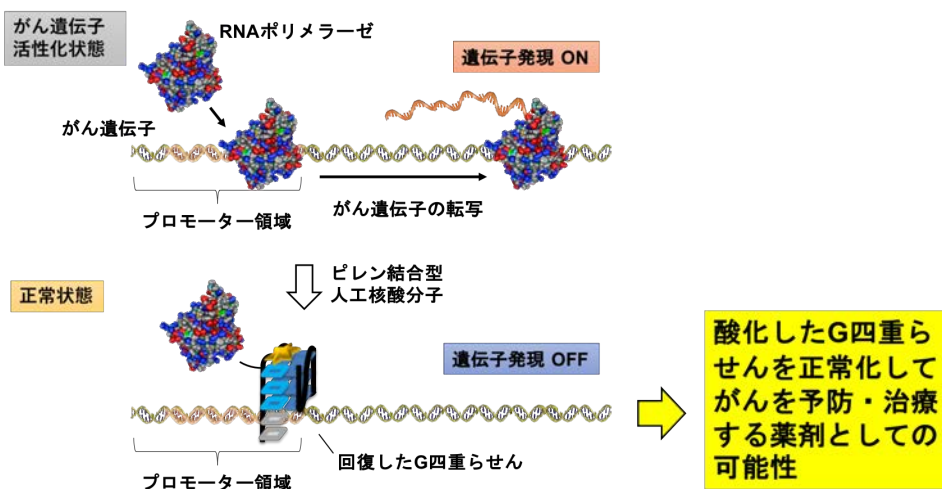
今般、杉本所長らのグループは、ヒトのがん遺伝子の一つである *VEGF* (血管内皮細胞増殖因子) 遺伝子に存在する G 四重らせん構造に酸化損傷が加わると、その四重らせん構造の形が変化し、機能が失われることを確認しました。これは四重らせんを構成する一本の鎖が酸化を受けることで損傷を受けていない他の三本の鎖との相互作用が変化したことが原因でした。そこで、損傷した一本の鎖の代わりとなる健全な DNA 鎖とその片末端に G 四重らせんを安定化する効果を持つ分子の一つであるピレンを共有結合させた人工核酸分子を作成しました (※2)。この人工核酸分子は、酸化損傷した G 四重らせんの一本の鎖と置き換わり、他の三本の鎖と安定に G 四重らせん構造を形成しました。形成した G 四重らせんは、その構造や遺伝子発現などの機能が非酸化体の G 四重らせんと同程度まで回復しました。さらに、他のがん関連遺伝子 (*c-Kit2*、*Bcl2* 遺伝子) や細胞のがん化に関わるテロメア由来の酸化した G 四重らせんも本人工核酸分子で同様に回復できました。近年次世代の医薬として核酸を用いた核酸医薬が注目されております。今回の開発した人工核酸分子は、あらゆる酸化損傷した G 四重らせんの構造と機能を回復し、がん予防・治療のための新規核酸医薬としての活用が期待されます。



参考資料1 G四重らせんによるがん遺伝子の発現抑制と酸化によるがん遺伝子の発現活性化メカニズム



参考資料2 ピレン結合型人工核酸分子による酸化体G四重らせんを正常化させるスキーム



参考資料3 がんの予防・治療を行うためにピレン結合型人工核酸分子は新規の核酸医薬としての利用が期待できる。

【内容説明】

背景

遺伝物質であるDNAの標準構造は二重らせん構造である一方、グアニン（G）四重らせんなどの特殊な構造も形成することができます（図1）。四重らせん構造はがん遺伝子上に多く見つかかり、がん遺伝子の発現を制御していることが明らかになりつつあります（図2）。このようなG四重らせんのグアニン塩基は、細胞内の活性酸素種により酸化されやすいことが分かっていますが、G四重らせんの酸化損傷とがん化の関連性やその予防・治療戦略についてはこれまで殆ど行われてきませんでした。

そこで研究グループは、がん遺伝子由来のG四重らせんが酸化損傷を受けた場合のG四重らせん構造を物理化学的に解析し、その機能を回復する新たな医薬品候補分子の開発を目指しました。

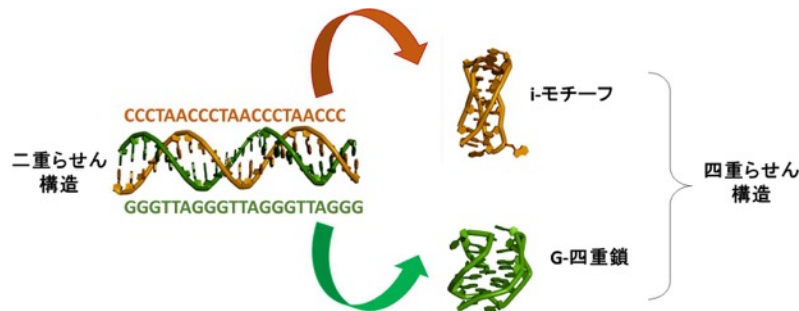


図1 DNAの標準構造と特殊構造

DNAにはアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）という4種類の塩基があり、AはTと、CはGと結合し（ワトソン・クリック塩基対を形成し）、二重らせん構造をつくる。さらに、G及びCの連続配列から成る二重らせんはそれぞれのDNA鎖が、G四重らせんやi-モチーフとよばれる特殊な四重らせん構造もつくることのできる。

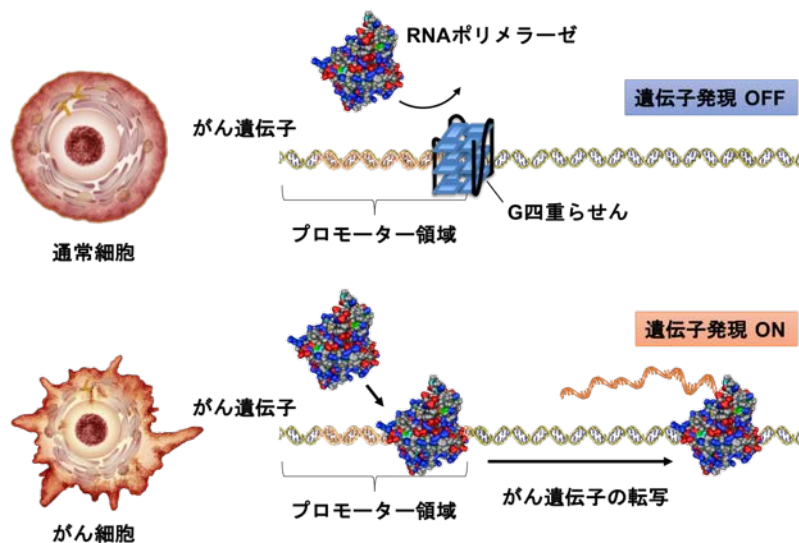


図2 G四重らせんによるがん遺伝子の発現制御

通常細胞ではがん遺伝子上の G 四重らせんが形成することで、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に結合できず、転写反応（DNA の情報を読み取り RNA 重合する反応）を開始できない。そのためがん遺伝子発現が抑制されている。一方、何らかの原因で四重らせん構造が形成されないと、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に結合できるようになり、転写反応が起こる。その結果がん遺伝子の発現が起こり、細胞のがん化やがんの悪化が生じる。

研究手法と成果

まず、がん遺伝子の一つであるヒト *VEGF*（血管内皮細胞増殖因子）遺伝子のプロモーター領域由来の G 四重らせん DNA のグアニン塩基を 1 箇所酸化体である 8-オキシグアニンに置換した DNA を合成し、その構造を解析しました（図 3A, B）。円二色性（CD）分光学的解析の結果、酸化体の G 四重らせんは非酸化体と比べて異なる CD スペクトルを示しました。（図 3C）。核磁気共鳴分光法（NMR）により酸化体では G 四重らせん構造に特徴的なイミノプロトンに由来する NMR ピークが変化、ブロード化しており、酸化体の G 四重らせんは異なる構造を形成していることが分かりました（図 3D）。

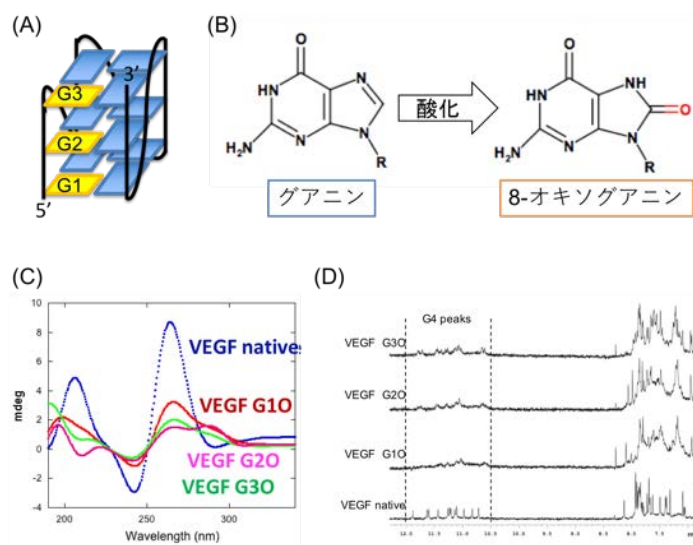


図 3 酸化損傷を受けた G 四重らせんの分光学的解析

(A) G 四重らせんの模式図。今回は 5' 末端側の 3 箇所（G1, G2, G3）のグアニン塩基のいずれかを酸化体である 8-オキシグアニンに置き換えた DNA を用いた。(B) グアニンと酸化体である 8-オキシグアニンの化学構造。(C, D) *VEGF* 遺伝子由来 G 四重らせんの未酸化（native）および各種酸化体の CD スペクトルおよび ^1H NMR スペクトル。

続いて、DNA 複製反応を用いて酸化体四重らせんの生化学的機能を調べました。鋳型となる DNA 鎖に酸化体の *VEGF* 遺伝子の G 四重らせんを配置し、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼ（※1）による DNA 複製効率を測定しました（図 4A）。非酸化体を含む配列の複製反応では、鋳型 DNA 上に形成された四重らせんによって Klenow Fragment の複製反応が途中で阻害されるのに対し、酸化体では途中で停止した産物はほとんど観察されませんでした

(図 4B)。以前杉本所長らが確立した、DNA 複製効率と四重らせんの構造熱安定性 (※2) の相関解析を適用したところ、酸化体は非酸化体と比べて異なる相関性を示すことが分かりました (図 4C)。複製反応における活性化エネルギー (※3) の比として、酸化体 G 四重らせんの複製は、非酸化体と比べて約 1/4 のエネルギー障壁でした。したがって、四重らせんの生化学的機能は酸化によって変化することが示されました。

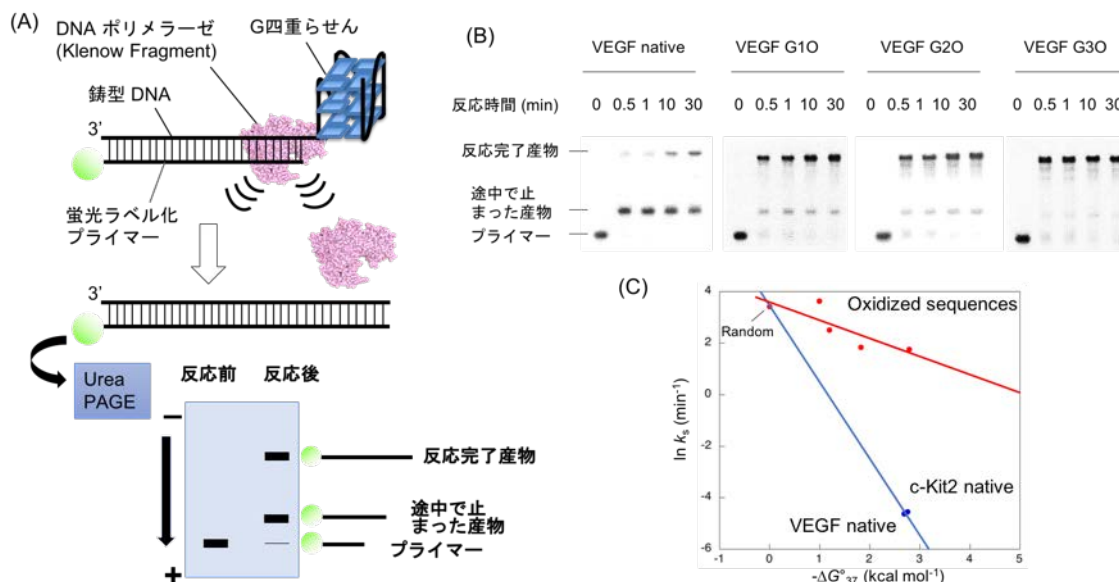


図 4 DNA 複製反応を用いた G 四重らせんの機能解析

(A) 複製反応の概略。鋳型 DNA に VEGF 遺伝子由来 G 四重らせんを配置し、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼによる複製効率を尿素変性ポリアクリルアミド電気泳動(Urea PAGE:※4) で複製産物を測定する。(B) 非酸化体および各種酸化体 G 四重らせんの複製反応結果。(C) DNA 複製効率と四重らせんの構造熱安定性の相関解析。直線の傾きが大きいほど複製に必要なエネルギー障壁が高いことを示す。非酸化体 (青のプロットからなる直線関係) と酸化体 (赤のプロットからなる直線関係) の相関性が異なることから、G 四重らせんは酸化されると生化学的機能が変化することが示された。

酸化体の G 四重鎖の機能を回復するために、杉本所長らのグループが開発したのは UGGGTT という DNA 配列の 5' 末端にピレンという蛍光性分子を共有結合させて作成した人工核酸分子 PyG3 です (図 5A)。ピレンは平面性の高い分子構造から、G 四重らせん構造をスタッキング相互作用で安定化することができるリガンド分子として知られています。PyG3 は G 四重らせんの一つの鎖であるグアニンの繰り返し配列 (GGG) を有するため、酸化損傷を受けた G 四重らせんの一本の鎖と置き換わって、他の四重らせんの鎖と相互作用することで、非酸化体と同様の G 四重らせん構造を回復するという設計です。実際 PyG3 と酸化体の G 四重らせんを混合し、構造解析を行うと、CD 測定の結果から、複合体の CD スペクトルは非酸化体と同様のスペクトルを示しました。さらに NMR スペクトル測定により、G 四重らせんに由来するシャープなイミノプロトンのピークが得られたことから、安定な G 四重らせんが形成されていることが確認できました。さらに複製反応に対する効果から、PyG3 を混合し

たことで途中で停止した産物が増加しました（図 5C）。ピレンを持たない DNA を添加した際には複製反応を停止する効果が無かったことから、今回作成したリガンド結合型人工核酸分子が効率的に酸化体の G 四重らせんと相互作用して、安定な G 四重らせんを形成することが確認できました。DNA 複製効率と四重らせんの構造安定性の相関解析からも、非酸化体の相関性にほぼ一致する関係性を示したことから、開発した人工核酸分子が酸化体の G 四重らせんの構造と機能を回復したことが示されました。

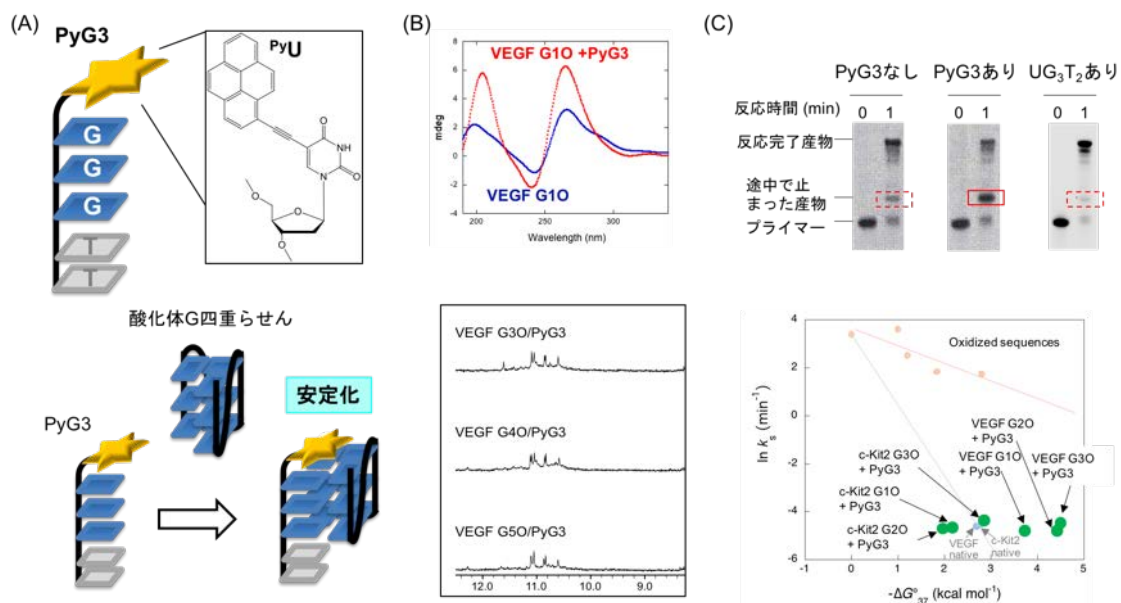


図 5 特殊 DNA 構造の複製速度とその安定性の相関性解析

(A) 今回開発した人工核酸分子 PyG3 の模式図。酸化体の損傷を受けた鎖と置き換わって G 四重らせんを安定に形成する。(B) PyG3 と酸化体 VEGF G 四重らせん複合体の構造解析。(C) PyG3 による酸化体 VEGF G 四重らせんの複製阻害効果および、DNA 複製効率と四重らせんの構造安定性の相関解析

今回開発した人工核酸分子は VEGF 由来の G 四重らせんだけでなく、他のがん遺伝子である *c-Kit2* や *Bcl2*、さらには細胞のがん化や寿命に関わるテロメア領域由来の G 四重らせんの酸化体についても構造と機能を回復することに成功しました。したがって、本人工核酸分子は酸化損傷した G 四重らせんに対して広く一般的に機能を回復できる分子であると考えられます。

展望・研究の波及効果

これまで、酸化など化学的に損傷をうけて機能を失った G 四重らせんを回復させる手法はありませんでした。今後、特定の四重らせんをターゲットにできるように改良を加えることで、特定のがん遺伝子の発現を抑え、がんの予防・治療ができる新しい核酸医薬の開発が期待できます。

【用語解説】

1、Klenow Fragment (※1)

大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I の複製反応を触媒する機能部位。DNA ポリメラーゼの基本構造は種を超えて広く保存されており、DNA ポリメラーゼのモデルとして用いられる。

2、熱安定性 (※2)

DNA 等の分子構造は形成と解離の平衡状態にあり、ちょうど構造形成および解離の状態が等しいときの温度を融解温度 (T_m) とよぶ。また、ある温度においてその平衡の自発的方向性を示すエネルギー値を、自由エネルギー (ΔG) として定量的に示すことができる。本研究ではヒトの生体内反応が行われる、大気圧、37°Cでの自由エネルギー値 ΔG_{37} を熱安定性の指標として用いた。単位は1 mol 当たりの熱量として kcal mol⁻¹を用いることが多い。

3、活性化自由エネルギー (※3)

反応が進行する際の遷移状態として定義される活性複合体を形成するために必要な自由エネルギー値のことを指す。

4、ゲル電気泳動 (※4)

ポリアクリルアミドなどのゲルを用いた DNA の分離技術。DNA は負電荷を帯びており、電圧を加えることで DNA はゲル中を陽極に向かって移動する。ゲルの網目構造により短い DNA ほど泳動距離が長くなる。

論文情報

論文名 Recovery of the formation and function of oxidized G-quadruplexes by a pyrene-modified guanine-tract.

著者 S. Takahashi, K. T. Kim, P. Podbevsek, J. Plavec, B. H. Kim, N. Sugimoto

掲載雑誌 *J. Am. Chem. Soc.*, 2018 accepted (**Supplemental Journal Cover**)

研究費

科学研究費補助金（科研費）：新学術領域「分子夾雜の生命化学」、A3 フォーサイトプログラム、基盤研究（A）・（C）

文部科学省戦略的基盤形成事業

島津科学技術振興財団

甲南学園平生太郎基金

甲南学園岡崎一雄先端科学研究奨励助成金

一般財団法人伊藤忠兵衛基金 文化厚生事業助成金